

CT/EP 99/508083
98/05804
EU
EPO - DG 1
14. 11. 1998

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Bescheinigung

REC'D	30 NOV 1998
WIPO	PCT

Herr Professor Dr. med. Dr. h.c. Wolf-Georg F o r s s m a n n
in Hannover/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Be-
zeichnung

"Native Plasmaform von humanem GLP-1"

am 12. September 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe
der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole
C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation
erhalten.

München, den 22. September 1998
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Patenzahlen: 197 40 081.7

Hoiß

971911de Me/Sch-gn

12. September 1997

Native Plasmaform von humanem GLP-1

Die vorliegende Erfindung betrifft die native Plasmaform von humanem GLP-1 (Glucagon Like Peptide 1), Verfahren zur Isolierung und Herstellung dieses Molekül sowie die Verwendung des Moleküls.

GLP-1 entsteht durch post-translationales Prozessieren von Proglucagon und stimuliert die Insulin und Somatostatinsekretion der Bauchspeicheldrüse und hemmt die Sekretion von Glucagon und Magensäure.

In klinischen Versuchen zeigte GLP-1 positive Effekte bei der Behandlung von Diabetikern, unter anderem in einen verminderten Insulinbedarf.

Überraschenderweise konnte nun aus Hämofiltrat ein Fragment des GLP-1 isoliert werden, das eine höhere biologische Aktivität aufweist als GLP-1.

Die Analyse ergab, daß es sich dabei um das Fragment 7-34 von GLP-1 handelt (GLP-1-7-34) gemäß Formel I

$\text{NH}_2\text{-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVK-COOH}$.

Formel I

Das Fragment und sein amidiertes Derivat gemäß Formel II wurden in einem Bioaktivitäts-Assay durch Messung der Bildung von cAMP nach Zugabe der isolierten Peptide bzw. Peptid-Derivate untersucht.

$\text{NH}_2\text{-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVK-CONH}_2$

Formel II

Die Aktivität wurde mit der Aktivität des bekannten Amids des GLP-1 Fragments GLP-1-(7-36) verglichen. Das GLP-1-(7-34) und sein Amid ergaben eine signifikant höhere Bildung von cAMP im Assay.

Das erfindungsgemäße Peptid kann außer durch Aufreinigung des GLP-1-Moleküls aus Hämofiltrat auch durch Peptidsynthese in dem Fachmann bekannter Weise hergestellt werden. Dabei können in bekannter Weise das Amid, weitere Derivate oder Fragmente synthetisiert werden.

Weiterhin ist die Herstellung des erfindungsgemäßen Peptids auch durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen möglich.

Das erfindungsgemäße Peptid eignet sich zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von insulinabhängigem Diabetes mellitus, nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus, zur Therapie von Hyperglykämien, Dyslipoproteinämien, zur Therapie von Fettsucht, zur Therapie von MODY (maturity-onset-diabetes of young people; Insulin-unabhängiger Diabetes mellitus), zur Behandlung sekundärer Hyperglykämien im Zusammenhang mit Pankreas-Erkrankung (chronische Pankreatitis, Pankreasektomie, Hämochromatose) oder endokrinen Erkrankung (Akromegalie, Cushing-Syndrom, Phäochromozytom oder Hyperthyreose), zur Behandlung medikamentös induzierter Hyperglykämie (Benzothiadiazin-Saluretika, Diazoxid oder Glukokortikoide), zur Therapie pathologischer Glukosetoleranz, zur Therapie von Hyperlipoproteinämien und zur Behandlung von Hypotonie.

Peptidhaltige Arzneimittel werden in dem Fachmann bekannter Weise für geeignete Applikationsweisen hergestellt.

Die Aufreinigung des Fragments soll durch folgendes Beispiel erläutert werden:

6800 l Hämofiltrat wurden mit Salzsäure auf einen pH von 3.0 angesäuert und auf 4°C gekühlt. Das Hämofiltrat wurde 1:3 (v/v) mit entionisiertem Wasser verdünnt und auf eine Kationenaustauschersäule aufgetragen. Die gebundenen Peptide wurden mit 0,5 M Natriumchlorid und anschließend mit 0,5 M Ammoniumacetat eluiert. Der Gehalt an GLP-1 bzw. seinen Fragmenten wurde durch einen Radioimmunoassay bestimmt. Das Ammoniumacetat-Eluat wurde an einer Membran mit einer Ausschlußgröße von 30.000 Dalton ultrafiltriert. Das Ultrafiltrat wurde in mehreren Reversed-Phase-Chromatographie-Schritten weiter aufgereinigt. Das gereinigte Fragment wurde massenspektrometisch und durch Aminosäuresequenzierung untersucht. Die Analyse der cAMP-Freisetzung erfolgte an RIN-Zellen. Etwa $5 \cdot 10^5$ Zellen in 500 µl Puffer (113 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 10 mM Hepes, 2,5 mM CaCl_2 , 1,2 mM MgSO_4 , pH 7,4), enthaltend 1% (w/v) humanes Serumalbumin, wurden für 10 Minuten bei 37° vorinkubiert und anschließend mit 2 µl einer 50 mM Lösung von 3-Isobutyl-1-methylxanthin versetzt, um die Degradierung des cAMP zu vermeiden. Durch Zugabe von 5 µl stark verdünnter Lösung des erfindungsgemäßen Peptidfragments bzw. seines amidierten Derivates wurde der Assay gestartet. Nach 10 minütiger Inkubation bei 37° wurde der Zellüberstand entfernt, die Zellen durch Zugabe von 500 µl 70%igem Ethanol lysiert, auf -70°C eingefroren und lyophilisiert. Der cAMP-Gehalt wurde durch einen Radioimmunoassay bestimmt.

Patentansprüche

1. Peptidfragment von GLP-1 mit der Aminosäuresequenz GLP-1-(7-34)

NH₂-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVK-COOH

und seine amidierten, phosphorylierten, acetylierten und/oder glycosilierten Derivate sowie Fragmente des GLP-1-(7-34) mit biologischer Aktivität des GLP-1.

2. Verfahren zur Isolierung von Peptidfragmenten gemäß Anspruch 1 als native Plasmaform von humanem GLP-1 durch Aufreinigung aus Hämofiltrat.
3. Verfahren zur Herstellung von Peptidfragmenten gemäß Anspruch 1 durch Festphasenpeptidsynthese.
4. Verfahren zur Herstellung von Peptidfragmenten gemäß Anspruch 1 durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen.
5. Verwendung des Peptidfragments gemäß Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von insulinabhängigem Diabetes mellitus, von nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus, Hyperglykämien, Dyslipoproteinämien, Fettsucht, MODY (maturity-onset-diabetes of young people), sekundärer Hyperglykämie durch Pankreas-Erkrankungen oder endokrine Erkrankungen, medikamentös induzierter Hyperglykämien, pathologischer Glukosetoleranz, Hyperlipoproteinämien und/oder Hypotonie.

Zusammenfassung

Peptidfragment von GLP-1 mit der Aminosäuresequenz GLP-1-(7-34)

NH₂-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVK-COOH

und seine amidierten, phosphorylierten, acetylierten und/oder glycosilierten Derivate sowie Fragmente des GLP-1-(7-34) mit biologischer Aktivität des GLP-1.